昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，April 2006，49(2)：213－218　ISSN 0454-6296

粉尘螨Ⅰ类变应原（**Der fⅠ**）的克隆表达、纯化及免疫学特性

朱健琦[1]**，刘志刚**[1,2*]**，高　波**[1]**，吉坤美**[2]**，邢　苗**[1,2]

（1. 深圳大学生命科学学院，广东深圳　518060；2. 深圳市微生物基因工程重点实验室，广东深圳　518060）

摘要：**粉尘螨Ⅰ类变应原（**Der fⅠ**）是粉尘螨** *Dermatophagoides farinae* **主要变应原，可引发**Ⅰ**型变态反应。挑取纯培养的粉尘螨，提取总** RNA**，采用** RT-PCR **方法有效地扩增出** Der fⅠ **片段，产物连接入** T **载体（**pMD18**）。经扩增后，用** *Nde*Ⅰ**和** *Xho*Ⅰ**双酶切后将目的片段连接到** pET24a **表达载体上，得到重组质粒** pET24a-Der fⅠ**，工程菌经** IPTG **诱导培养，高效表达出** Der fⅠ**蛋白，该蛋白主要以包涵体形式存在。表达产物经亲和层析纯化，用** Western blot **及** ELISA **方法检测免疫学活性，结果表明目的蛋白具有良好的免疫原性。**

关键词：**粉尘螨；变应原；表达；纯化；特性鉴定**

中图分类号：Q966　　文献标识码：A　　文章编号：0454-6296(2006)02-0213-06

Cloning, expression, and purification of Der fⅠ gene and its immunological characteristics

ZHU Jian-Qi[1]，LIU Zhi-Gang[1,2*]，GAO Bo[1]，JI Kun-Mei[2]，XING Miao[1,2]（1. College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China; 2. Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, Shenzhen, Guangdong 518060, China）

Abstract: Der fⅠ is a major allergen of *Dermatophagoides farinae*, which can induce the type Ⅰ allergy. In this study, the live mites of South China area which had been identified and cultured were picked. The total RNA was extracted. The Der fⅠ gene fragment was amplified with RT-PCR, cloned into pMD18-T vector, and sub-cloned into the expression vector pET. The recombinant plasmid pET24a-Der fⅠ so constructed was expressed through the induction of IPTG. The expressed Der fⅠ protein was purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Recombinant Der fⅠ protein was expressed in *E. coli* host strain BL21 star in the form of inclusion body, and its allergenicity was confirmed by the western blot.

Key words: *Dermatophagoides farinae*; allergen; expression; purification; characterization

尘螨是世界性分布的重要变应原，广泛存在于自然界，室内主要分布在卧具、沙发和地面上，其分泌物、排泄物和皮壳碎片等以尘埃颗粒飞扬于空气中，过敏体质者吸入后，可诱发Ⅰ型变态反应，从而引起哮喘、过敏性鼻炎、异位性皮炎和荨麻疹等多种变态反应性疾病（过敏性疾病）（徐瑞霞和蒋鹤龄，1997）。在已知的数十种尘螨中，与人类过敏性疾病关系最密切的主要有户尘螨（*Dermatophagoides pteronyssinus*，Der p）和粉尘螨（*Dermatophagoides farinae*，Der f）。尘螨的粪便、唾液、分泌物及尸体的降解产物皆会造成过敏反应。目前根据尘螨致敏物质的结构成分、序列及分子量，将其分成了十几种，大部分类别的分子量、酶的功能、IgE 的结合率和结合力以及含量等均已测得。现已明确报道的尘螨变应原有 16 种之多，其中以 1 类和 2 类变应原最重要。在尘螨过敏患者的血清中，70%～80%患者的 IgE 结合这两类抗原，并呈现强反应性（Platts-Mills *et al.*，1992）。这两类变应原的 cDNA、氨基酸序列及 TCR 的识别位点（表位）都已明确，且不同地区获得的野生型尘螨变应原存在序列多态性。目前，利用

基金项目：国家“863”计划（2002AA214011）；国家自然科学基金项目（30471505，30271226）；广东省科技重大专项（2003A3080502）；深圳市科技计划项目

作者简介：朱健琦，女，1981 年生，湖南人，硕士研究生，主要从事变态反应学方面的研究，E-mail：szjudy@163.com

* **通讯作者** Author for correspondence，E-mail：lzg@szu.edu.cn

收稿日期 Received：2005-01-24；**接受日期** Accepted：2005-08-15

尘螨的主要变应原来检测尘螨过敏和进行免疫治疗是非常重要的手段。我国曾报道使用单抗层析、凝胶过滤、聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法分离纯化粉尘螨 Der f1 和 Der f4 等变应原成分（钟建敏和温廷桓，1993；谢建云和温廷桓，1996）。目前国外应用重组的方法制备变应原已有较多的报道，但国内仅见少量报道（Liu *et al.*，2004；高波等，2004）。本文作者利用基因工程技术克隆出了 Der fⅠ 基因，并利用 pET 原核系统进行高效表达，经纯化后获得大量具有良好的 IgE 结合活性的 Der fⅠ重组变应原。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

原核表达载体 pET24a 购自 Invitrogen 公司。pMD18-T 载体、Ex-Taq 酶、限制性内切酶 *Nde* Ⅰ与 *Xho* Ⅰ、T4 连接酶、DNaseI 均购自 TaKaRa 公司。DNA 片段纯化试剂盒购自 BBI 公司。Ni-NTA matrix 及柱子购自 Amersham Pharmacia 公司。

1.2 血清

血清取自深圳市第一人民医院和广州医学院第二附属医院变态反应科，临床上选择经粉尘螨皮试的慢性哮喘和过敏性鼻炎患者 30 例，所有患者无传染病史，粪检虫卵阴性。分别采集静脉血各 5 mL，经 37℃静置 4 h，然后 5 000 × g 离心 5 min 收集上层血清，选用法码西亚 CAP 变应原自动检测系统或 MAST 变应原检测系统，收集粉尘螨特异性 IgE 阳性且反应达 3 级或 3 级以上的患者血清，分装后 –80℃低温保存备用。

1.3 粉尘螨总 RNA 的提取

采用本室纯培养的粉尘螨 300 只，液氮研磨后用 Qiagen 公司试剂盒进行总 RNA 的提取。

1.4 RT-PCR 扩增及其产物的克隆与鉴定

RT-PCR 的逆转录反应采用非特异性引物。后继 PCR 反应引物反应是根据 GenBank 提供的 Der fⅠ序列设计的特异性引物，上游引物为 5′-TGCCATATGCGTCCAGCTTCAATCAAAACT-3′，下游引物为 5′-CGACTCGAGGAGAATGACAACATATGGATATTGT-3′，其中分别插入 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ的酶切位点及保护性碱基。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应参数为：94℃预变性 5 min，接着 94℃ 30 s，58℃ 1 min，72℃ 2 min，最后 72℃延伸 10 min。将扩增产物回收纯化，并连接到 pMD18-T 载体上。将重组质粒转化进克隆菌 *E. coli* Top10。通过含 Amp、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板进行蓝白斑和抗氨苄筛选，挑取白色菌落（含重组质粒），LB/Amp 培养，碱裂解法提取质粒，并用 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切鉴定。再测定该片段的 DNA 序列（由上海生工生物工程有限公司完成）。

1.5 构建重组表达质粒

利用上述引物的酶切位点，将 PCR 扩增片段与原核表达载体 pET24a 分别用 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切，并将所获 Der fⅠ基因片段与 pET24a 的酶切产物相互连接，构建重组表达质粒 pET24a-Der fⅠ。以重组质粒转化 Top10 感受态大肠杆菌，扩增后提取质粒，再用双酶切鉴定阳性克隆，经测序鉴定后用于诱导表达。

1.6 Der fⅠ 蛋白的诱导表达

以上述鉴定的 pET24a-Der fⅠ转化感受态大肠杆菌 BL21 star（DE3），待细菌生长处于对数生长期（A_{600nm} = 0.6 ~ 0.8）时，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG，诱导蛋白表达。5 h 后取 1 mL 菌液，4℃下离心弃去上清液，沉淀重悬于 50 μL 1 × PBS，取 10 μL 与等量 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液混合，煮沸 5 min，取 8 μL 上样进行电泳来检测表达情况。在上述表达产物中，加入溶菌酶至终浓度为 0.5 mg/mL，室温放置 30 min 并反复冻融数次后，加 DNaseI 至终浓度为 20 g/mL，室温放置 30 min，离心后分别取上清液与沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 包涵体的洗涤、纯化及变复性研究

将分离的包涵体，以包涵体洗涤液Ⅰ（1% Triton X-100、50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl 及 10 mmol/L EDTA）150 mL 洗涤，4℃搅拌 20 min，以 10 000 × g 离心 10 min，弃去上清液。再用包涵体洗涤液Ⅱ（2 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl）洗涤，搅拌 20 min，10 000 × g 离心 10 min，弃去上清液，沉淀以 50 mL 包涵体溶解液（8 mol/L 尿素、50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl）溶解完全后，4℃下 10 000 × g 离心 15 min，取上清液。将上清液上样于已用平衡缓冲液（6 mol/L 尿素、50 mmol/L PB、200 mmol/L NaCl 及 30 mmol/L 咪唑）预平衡过的 Ni-NTA 柱，上样速度 1 mL/min。上样完毕后，先用平衡缓冲液充分洗柱，后分别用含 200、400、600 mmol/L 咪唑的平衡缓冲液进行梯度洗脱。分步分管收集各次的洗脱液，分别取样进行 SDS-PAGE 分析，并用 Bradford（1976）法测定蛋白浓度。用梯度透析法进行复性，先用含 2 mol/L 尿素的复性液（50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L GSH、0.2

mmol/L GSSG)透析，再用含 0.2 mol/L 尿素的复性液透析，最后用含 0.2 mol/L EDTA 的 PBS 透析。

1.8　免疫学特性鉴定

经临床上用法码西亚 CAP 变应原自动检测系统或 MAST 变应原检测系统，检测为粉尘螨特异性 IgE 阳性且反应达 3 级或 3 级以上的患者血清，作为一抗，按上述方法进行 SDS-PAGE，经胶湿法转膜后进行 Western Blot 分析[参照 Sambrook 等(1989)方法]，DAB 染色，了解重组的 Der f Ⅰ 蛋白是否有免疫原性。

2　结果与分析

2.1　RT-PCR 扩增 Der f Ⅰ 片段

用活粉尘螨提取总 RNA 为模板，分别使用特异性引物和 Oliga dT，通过 RT-PCR 得到的产物，经琼脂糖凝胶电泳，可见约 900 bp 左右的条带，大小与理论预计值相符(图 1)。

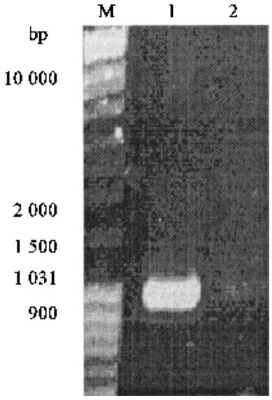

图 1　粉尘螨 Der f Ⅰ 的 RT-PCR 产物电泳图

Fig.1　RT-PCR amplification of Der f Ⅰ

M：DNA 梯度 DNA ladder；1：Der f Ⅰ 基因 RT-PCR 产物(特异性引物) RT-PCR to amplify Der f Ⅰ from mite mRNA with specific primer；2：Der f Ⅰ 基因 RT-PCR 产物(Oliga dT 引物) RT-PCR to amplify Der f Ⅰ from mite mRNA with Oliga dT as primer.

2.2　重组载体 pMD18-T-Der f Ⅰ 的构建及测序

将回收后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上，挑取阳性克隆进行双酶切鉴定，所得插入片段与 RT-PCR 产物的电泳分子量一致(图 2)。经测定 Der f Ⅰ 基因的序列，发现与 GenBank 公布的 Der f Ⅰ 序列(登录号：AF285763.1)完全一致。

2.3　表达载体 pET24a-Der f Ⅰ 的构建、酶切及序列鉴定

将构建的重组表达质粒 pET24a-Der f Ⅰ 扩增，对阳性克隆进行 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切和琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明，载体片段约为 5 000 bp，插入的 Der f Ⅰ 基因片段为 900 bp，均同预期的大小相一致(图 3)。对阳性克隆进行 DNA 序列测定，以确保插入的 Der f Ⅰ 片段准确无误。所构建的重组质粒的表达产物带有六组氨酸标签(6 His tag)，可用于蛋白的纯化和鉴定。

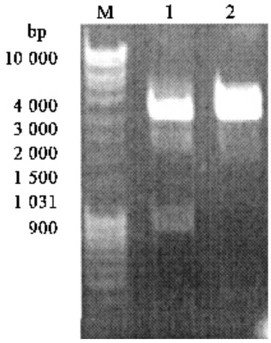

图 2　粉尘螨 pMD18-T-Der f Ⅰ 质粒的 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切鉴定

Fig. 2　The restriction analysis for pMD18-T-Der f Ⅰ with *Nde* Ⅰ and *Xho* Ⅰ

M：DNA 梯度 DNA ladder；1：pMD18-T-Der f Ⅰ 质粒 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后 pMD18-T-Der f Ⅰ digested with *Nde* Ⅰ and *Xho* Ⅰ；2：pMD18-T-Der f Ⅰ 质粒 pMD18-T-Der f Ⅰ.

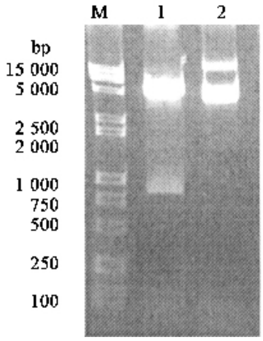

图 3　粉尘螨 pET24a-Der f Ⅰ 质粒的 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切鉴定

Fig. 3　The restriction analysis for pET24a-Der f Ⅰ with *Nde* Ⅰ and *Xho* Ⅰ

M：DNA 梯度 DNA ladder；1：pET24a-Der f Ⅰ 质粒 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切后 pET24a-Der f Ⅰ digested with *Nde* Ⅰ and *Xho* Ⅰ；2：pET24a-Der f Ⅰ 质粒 pET24a-Der f Ⅰ.

2.4　克隆菌株重组蛋白的表达和纯化

含有 pET24a-Der f Ⅰ 的阳性克隆菌株经 IPTG 诱导，表达蛋白进行 SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色，结果显示阳性克隆菌株在 25 kD 左右处有外源蛋白表达条带出现，蛋白分子量与预计值相符(图 4)。破碎菌体后分别取上清液和沉淀进行可溶性分析，经 SDS-PAGE 显示，Der f Ⅰ 蛋白只在沉淀中大量累积(图 5)，表明 Der f Ⅰ 是组成型蛋白，主要以包涵体的

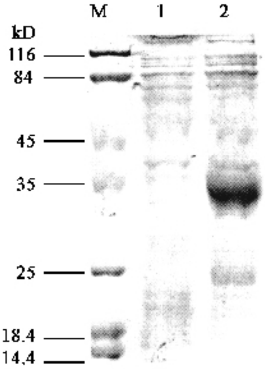

图 4 粉尘螨 BL21 star/pET24a/Der f Ⅰ **的表达**

Fig. 4 Expression of BL21 star/pET24a/Der f Ⅰ

M：**蛋白质分子量标准** Protein molecular weight marker；1：BL21 star/pET24a/Der f Ⅰ **诱导前** BL21 star/pET24a/Der f Ⅰ induced by IPTG；2：BL21 star/pET24a/Der f Ⅰ **诱导后** BL21 star/pET24a/Der f Ⅰ without induction.

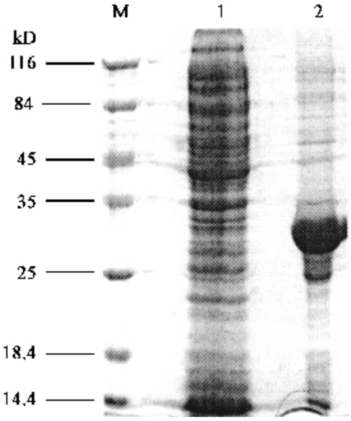

图 5 粉尘螨 Ⅰ 类变应原 Der f Ⅰ **表达形式的** SDS-PAGE **分析**

Fig. 5 Analysis of expression pattern of Der f Ⅰ protein by SDS-PAGE

M：**蛋白质分子量标准** Protein molecular weight marker；1：**细菌裂解上清液** Supernatant of bacterial lysate after sonication；2：**包涵体沉淀** Inclusion body.

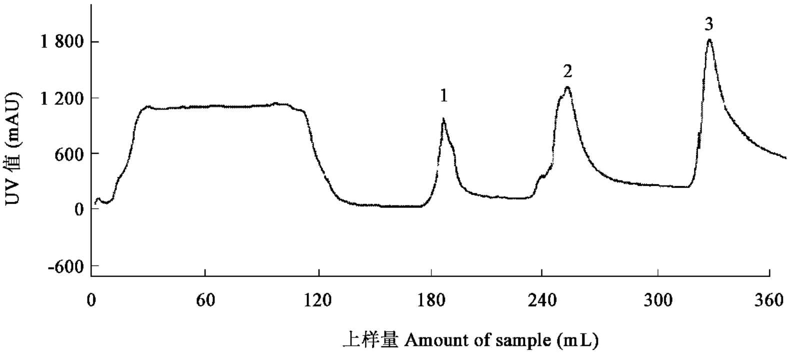

图 6 重组蛋白 Der f Ⅰ **的亲和层析**

Fig. 6 Purification of Der f Ⅰ protein by affinity chromatography

1：50 mmol/L **咪唑洗脱液** 50 mmol/L imidazole for desorption；2：200 mmol/L **咪唑洗脱液** 200 mmol/L imidazole for desorption；3：400 mmol/L **咪唑洗脱液** 400 mmol/L imidazole for desorption.

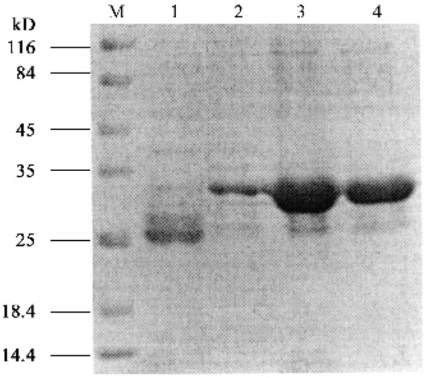

图 7 Der f Ⅰ **纯化结果的** SDS-PAGE **分析**

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of affinity chromatography

M：**蛋白质分子量标准** Protein molecular weight marker；1：6 mol/L **尿素缓冲液** 6 mol/L urea buffer；2：50 mmol/L **咪唑洗脱液** 50 mmol/L imidazole for desorption；3：200 mmol/L **咪唑洗脱液** 200 mmol/L imidazole for desorption；4：400 mmol/L **咪唑洗脱液** 400 mmol/L imidazole for desorption.

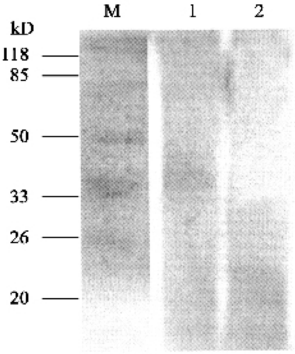

图 8 重组蛋白 Der f Ⅰ **的** Western blot **检测**

Fig. 8 Western blot analysis of Der f Ⅰ protein

M：**蛋白质分子量标准** Prestained protein marker；1：**病人血清** Patient's serum；2：**健康人血清** Normal person's serum.

形式在菌体内表达。利用pET载体5′端的六组氨酸标签，采用Ni柱亲和层析的方法纯化Der fⅠ重组蛋白(图6)。收集各峰峰液，进行SDS-PAGE分析(图7)。

2.5　重组蛋白的免疫原性测定

用粉尘螨过敏患者的血清作为一抗进行的Western blot实验，证实该蛋白能与患者血清的特异性IgE结合，证明诱导表达和纯化的重组蛋白均具过敏免疫原性(图8)。

3　讨论

目前，临床上对尘螨过敏患者进行体内外诊断和特异性免疫治疗时，仍广泛使用尘螨粗浸液，但由于天然变应原提取液的组分非常复杂，恒定其组分非常困难，且容易受外源性有毒物质、病原微生物的污染，影响其重复性与安全性。特别是螨类变应原，需人工饲养尘螨至一定量方可提取，来源珍贵(郝敏麒等，2001)。而重组变应原疫苗具有纯度高、无杂蛋白，易标准化，无外源性毒性物质和病原微生物污染的优势，临床上已有用于免疫治疗(张宏誉和叶世泰，1985；冷炜和温廷桓，2002)。因此，利用基因重组的方法制备变应原，无疑为变应性疾病的诊断与治疗起到重要作用，重组变应原的研究成为当今变态反应性疾病的研究热点之一(Bozza *et al*.，2002；Gronlund *et al*.，2002)。

粉尘螨是常见的吸入性致敏原之一，它的主要变应原包括Der fⅠ和Der fⅡ。Der fⅠ(1类变应原)源自于尘螨消化道的上皮细胞，主要是用来消化食物，含有223个氨基酸残基，分子量为25 kD，是具有半胱氨酸蛋白酶活性的糖蛋白。其氨基酸序列与其他半胱氨酸蛋白酶有高度的同源性。Der fⅠ与Der pⅠ核苷酸序列的同源性为81%，尤其构成这些酶的活性位点以及半胱氨酸位点的残基更具保守性。在两种螨变应原中其潜在的N末端糖基化位点表达在相同的位置(Dilworth *et al*.，1991；陈建军，2003)。对Der fⅠ的功能及表位的研究较深入，并在小鼠的动物模型中发现有些表位肽可经口服诱导粘膜耐受(Jarnicki *et al*.，2002)。Der fⅡ(2类变应原)是一种分子量为14 kD，包含129个氨基酸残基的蛋白，无N-末端糖基化位点和保守的半胱氨酸残基。

20世纪80年代以来，尘螨的Ⅰ类变应原和Ⅱ类变应原及其他主要变应原已经被分离纯化克隆并应用于免疫学研究(Chapman and Platts-Mills，1980；Yasueda *et al*.，1986)。在国内，郝敏麒等(2001，2003)曾报道使用RT-PCR的方法，克隆华南地区粉尘螨主要变应原Der f1和Der f2的cDNA片段。其中，从广州地区的粉尘螨中所克隆的Der f1和GenBank中报告的序列有高度的同源性，仅有6个碱基的差异，其推导的编码氨基酸序列是完全一致的(登录号：AF285763)，这种差异没有影响其抗原表达部位的改变。

本研究克隆出的Der fⅠ片段，测序后表明与郝敏麒等(2001)获得的基因序列(gb|AF285763.1|)完全一致，同源性为100%，与GenBank上去除内含子后的基因序列(emb|X65196.1|)同源性为99%，其中6个碱基不同。我们提取粉尘螨的总RNA，采用自行设计的引物，通过RT-PCR成功地克隆了Der fⅠ的基因，并连接到T载体上，经*Nde*Ⅰ和*Xho*Ⅰ双酶切及测序均证实已克隆到了正确的目的基因片段。将该片段连接到原核表达载体pET上，双酶切结合测序结果表明确实构建了正确的重组表达质粒pET-Der fⅠ。SDS-PAGE分析表面重组蛋白在宿主大肠杆菌BL21 star菌株中得到了高效表达，并且主要以包涵体的形式存在。通过亲和层析和包涵体变、复性获得纯度较高的蛋白，并使用粉尘螨过敏的病人血清进行Western blot实验，结果表明重组的Der fⅠ能和尘螨过敏病人血清中的Ig E结合，说明重组变应原具有免疫原性。

利用基因重组技术在体外大量表达具有抗原性的重组变应原是变态反应性疾病诊断与脱敏疫苗研究中的重要途径。国外虽然有关于粉尘螨主要变应原克隆的报道，但国内对粉尘螨的重组变应原研究还未见报道，另外不同地区变应原的种类有其区域特色，物种也有其自身的基因多态性，不同地区同一种变应原可能存在一定差异，故无论从改进现有的免疫诊断用粗抗原，提高检测的敏感性与特异性，还是从研制用于变态反应疾病分子疫苗的目标考虑，构建粉尘螨主要变应原Der fⅠ的高效表达质粒，制备出高纯度变应原都是十分必要的(Arruda *et al*.，1995)。因此，本实验构建了高效原核表达载体，并表达和纯化了粉尘螨主要变应原Der fⅠ，同时还证实重组的Der fⅠ具有和特异ⅠgE结合的免疫学特性，这将为粉尘螨变态反应性疾病的特异性诊断及进一步的实验研究奠定了基础。

参考文献(References)

Arruda LK，Vailes LD，Mann BJ，Shannon J，1995. Molecular cloning of a

major cockroach（*Blattella germanica*）allergen，Bla g2：Sequence homology to the aspartic protease. *Biol. Chem.*，270(33)：19 563 - 19 568.

Bozza S，Gaziano R，Lipford GB，2002. Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Micro. Inf.*，4(13)：1 281 - 1 290.

Chapman MD，Platts-Mills TAE，1980. Purification and characterization of the major allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus*-antigen P1. *J. Imm.*，125：587 - 592.

Chen JJ，2003. Research progress of house dust mite allergens. *Foreign Medical Sciences：Immunology*，26(5)：273 - 275. [陈建军，2003. 尘螨变应原研究进展. 国外医学·免疫学分册，26(5)：273 - 275]

Dilworth RJ，Chua KY，Thomas WR，1991. cDNA encoding the major mite allergen Der fⅡ. *Clin. Exp. Allergy*，21(1)：33 - 37.

Gao B，Liu ZG，Su DM，2004. Refolding of the cockroach allergen Cr PⅠ from inclusion bodies. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*，11(2)：96 - 99. [高波，刘志刚，苏东明，2004. 蟑螂变应原 Cr-P1 包涵体的变复性研究. 寄生虫与医学昆虫学报，11(2)：96 - 99]

Gronlund H，Vrtala S，Wiedermann U，2002. Carbohydrate-based particles：a new adjuvant for allergen-specific immunotherapy. *Immunology*，107(4)：523 - 529.

Hao MQ，Xu J，Zhong NS，2001. Cloning and sequence analysis of cDNA coding for group Ⅰ allergen of *Dermatophagoides farinae*（Der fⅠ）. *Immunological Journal*，17(3)：234 - 236. [郝敏麒，徐军，钟南山，2001. 粉尘螨Ⅰ类变应原(Der fⅠ)的 cDNA 克隆与序列分析. 免疫学杂志，17(3)：234 - 236]

Hao MQ，Xu J，Zhong NS，2003. cDNA cloning and sequence analysis of major allergen of *Dermatophagoides farinae*（Der f2）in south China. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*，21(3)：160 - 163. [郝敏麒，徐军，钟南山，2003. 华南地区粉尘螨主要变应原 Der f2 的 cDNA 克隆及序列分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，21(3)：160 - 163]

Jarnicki AG，2002. Stimulatory and inhibitory epitopes in the T cell responses of mice to Der p1. *Clin. Exp. Allergy*，32：942 - 950.

Leng W，Wen TH，2002. Standardization of allergen steep. *Chinese Pharmaceutical Affairs*，16(5)：307 - 310. [冷炜，温廷桓，2002. 关于变应原浸液的标准化. 中国药事，16(5)：307 - 310]

Liu ZG，Gao B，He YH，2004. Construction and primary characterization of cDNA expression library of *Artemisia apiacea* pollen. *Acta Biol. Biop. Sin.*，36(2)：165 - 166.

Platts-Mills TA，Thomas WR，Aalberse RC，1992. Dust mite allergens and asthma：Report of a second international workshop. *Allergy Clin. Immu.*，89：1 046 - 1 060.

Sambrook KJ，Fritsch EF，Maniatis T，1989. Molecular Cloning：A Laboratory Manual. 3rd ed. New York：Cold Spring Harbor Laboratory.

Xie JY，Wen TH，1996. Purification of Der f4 allergen of *Dermatophagoides farinae* and identification of its amylase activity. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*，14(2)：119 - 123. [谢建云，温廷桓，1996. 粉尘螨 Der f 4 变应原的提纯及其淀粉酶活性分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，14(2)：119 - 123]

Xu RX，Jiang HL，1997. The curative effect of 31 patients treated with house dust mite steep. *Anhui J. Prev. Med.*，3(1)：68 - 69. [徐瑞霞，蒋鹤龄，1997. 尘螨浸液治疗 31 例变态反应性疾病疗效观察. 安徽预防医学杂志，3(1)：68 - 69]

Yasueda H，Mita H，Yui Y，1986. Isolation and characterization of two allergens from *Dermatophagoides farinae*. *Int. Arch. Allergy Appl. Imm.*，81：214 - 223.

Zhang HY，Ye ST，1985. Standardization of allergen. *Foreign Medical Sciences：Immunology*，23(2)：113 - 116. [张宏誉，叶世泰，1985. 变应原的标准化. 国外医学·免疫学分册，23(2)：113 - 116]

Zhong JM，Wen TH，1993. Prurification of Der f4 allergen of *Dermatophagoides farinae* and identification of its physical and chemistry characteristics. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*，11(3)：204 - 206. [钟建敏，温廷桓，1993. 粉尘螨变应原的提纯及物理化学特征鉴定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，11(3)：204 - 206]

（责任编辑：黄玲巧）